

## 미성숙 암컷 흰쥐 시상하부-뇌하수체 축 상의 유전자 발현에 미치는 Vinclozolin 투여 효과

이 우 철 · 이 성 호<sup>†</sup>

상명대학교 생명과학전공

### Effect of Vinclozolin Administration on the Gene Expressions in Hypothalamus-Pituitary Axis of Immature Female Rats

Woocheol Lee and Sung-Ho Lee<sup>†</sup>

Dept. of Life Science, Sangmyung University, Seoul 110-743, Korea

**ABSTRACT** : Vinclozolin (VCZ) is a systemic fungicide commonly used in fruits, vegetables and the wine industry. VCZ and its metabolites, butenoic acid (M1) and enanilide (M2) derivatives, act as anti-androgens through actions on the androgen receptor. Although there is growing body of evidence that VCZ's action as an endocrine disrupting chemical (EDC) in male reproductive physiology and pathophysiology, no evidence on the VCZ's EDC action in female is available yet. Previously we found that the prepubertal VCZ exposures could effectively delay the onset of puberty in female rats, suggesting the postponed or weakened activities of hypothalamus-pituitary-ovary (H-P-O) reproductive hormonal axis. The present study was performed to examine whether the VCZ administration affects the transcriptional activities of reproductive hormone-related genes in the same animal model. VCZ (10 mg/kg/day) was administered daily from postnatal day 21 (PND 21) through the day when the first vaginal opening (V.O.) was observed. To determine the transcriptional changes of reproductive hormone-related genes in hypothalamus and pituitary, total RNAs were extracted and applied to the semi-quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). As a result, treatment with VCZ significantly lowered the transcriptional activity of nitric oxide synthase-2 (NOS-2) which is known to adjust gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretion in the hypothalamus ( $p < 0.01$ ). Similarly, the mRNA levels of *Kiss-1*, G protein-coupled receptor 54 (GPR54) and GnRH were significantly decreased in hypothalamus ( $p < 0.01$ ) from VCZ-treated group. As expected, the transcriptional activities of luteinizing hormone- $\beta$  (LH- $\beta$ ) and follicle stimulating hormone- $\beta$  (FSH- $\beta$ ) in the anterior pituitary from VCZ-treated group were also significantly lower than those from the control group. The present study indicates that (i) the inhibitory effect of VCZ exposure on the onset of puberty in immature female rats could be derived from the reduced transcriptional activities of gonadotropin subunits and their upstream modulators such as GnRH and *Kiss-1* in hypothalamus-pituitary neuroendocrine axis, and (ii) these inhibitory effects could be mediated by NO signaling pathway.

**Key words** : Vinclozolin, Hypothalamus-pituitary neuroendocrine axis, Gonadotropins, Gonadotropin-releasing hormone, NO.

요 약 : Vinclozolin (VCZ)은 침투성 살균제로써 과일, 채소, 와인산업에 널리 사용된다. VCZ와 그것의 대사산물들인 butenoic acid (M1)과 enanilide (M2)는 안드로젠 수용체를 놓고 항 안드로젠 물질로 작용한다. VCZ가 수컷의 생식생리와 병리에서 내분비계 장애물질(endocrine disrupting chemical, EDC)로 작용함에 대한 증거는 많이 있지만, 암컷 생식생리에 미치는 VCZ의 효과에 대한 증거는 전무하다. 본 연구자들은 이전 연구에서 VCZ가 미성숙 암컷 흰쥐의 사춘기 개시를 유의하게 지연시킴을 보고한 바 있는데, 이는 VCZ에 의해 시상하부-뇌하수체-난소(hypothalamus-pituitary-ovary, H-P-O)

생식 호르몬 축의 활성이 지연되거나 약화됨을 시사한다. 본 연구에서는 미성숙 암컷 흰쥐들의 VCZ 투여가 암컷 흰쥐의 시상하부-뇌하수체 축의 생식 호르몬 관련 유전자들 활성에 미치는 영향을 조사하였다. VCZ (10 mg/kg/day)

<sup>†</sup> 교신저자: 서울특별시 종로구 홍지동 7, 상명대학교 생명과학전공,  
(우) 110-743, (전) +82-2-2287-5139, (팩) +82-2-2287-0070; E-mail:  
shlee@smu.ac.kr

를 생후 21일부터 첫 번째 질구개방이 관찰되는 날까지 매일 복강주사하였다. 시상하부와 뇌하수체의 표적 유전자들의 전사적인 변화량을 측정하기 위하여, total RNA를 추출하였고 반 정량적 역전사 중합효소반응(RT-PCR)을 실시하였다. VCZ 투여군에서 시상하부의 gonadotropin-releasing hormone (GnRH)의 분비를 조절함이 알려진 nitric oxide synthase-2 (NOS-2)의 전사활성은 대조군보다 유의하게 감소하였다( $p < 0.01$ ). 유사하게, VCZ 투여군의 시상하부에서의 *Kiss-1*, G protein-coupled receptor54 (GPR54) 그리고 GnRH mRNA 수준도 감소하였다( $p < 0.01$ ). 예상대로, VCZ 투여군의 뇌하수체 luteinizing hormone- $\beta$  (LH- $\beta$ )과 follicle stimulating hormone- $\beta$  (FSH- $\beta$ ) 전사활성도 대조군에 비하여 유의하게 감소하였다( $p < 0.01$ ). 이번 연구를 통해 미성숙 암컷 흰쥐의 VCZ 노출시 사춘기 개시의 지연효과는 시상하부-뇌하수체 신경내분비 축의 GnRH와 *Kiss-1*같은 성선자극호르몬들과 그들의 상위조절인자들의 전사 활성의 감소에 의해 야기되고, 아마도 nitric oxide (NO) 신호전달경로에 의해 조절됨을 시사한다.

## 서론

Dicarboximide계 살균제인 Vinclozolin (VCZ)은 일반적으로 상추, 포도, 딸기, 콩과식물, 유채 등 과일이나 채소들의 균 포자 발아를 억제시키며, 미국, 유럽 등 전 세계적으로 광범위하게 사용되는 내분비계 장애물질(endocrine disrupting chemical, EDC)이다(Kelce et al., 1995; Gray et al., 1999). VCZ와 그 대사산물들인 M1과 M2가 항 안드로젠성 내분비계 장애물질임은 체외 배양에서 안드로젠 수용체(androgen receptor, AR) 단백질과의 결합결합 측정법을 사용하거나, 포유류 세포에서 전사활성 측정법을 사용하여 확인되었다(Kelce et al., 1994; Wong et al., 1995; Nellemann et al., 2003; Molina-Molina et al., 2006). 13주령의 수컷 흰쥐에 VCZ (100 mg/kg/day)를 6일간 경구투여한 결과, 정소 내 정자 수는 유의하게 감소하였고, 혈중 LH와 FSH는 음성 되먹임 작용으로 인하여 오히려 상승하였다(Kubota et al., 2003). 임신기 어미가 VCZ에 노출되면(*in utero*) 후에 태어나는 수컷 새끼들의 비노생식계의 이상(Gray et al., 1994; Matsuura et al., 2005), 사춘기 개시와 성 부속선들의 성장과 발달 지연(Gray et al., 1999), 성체기 성 부속선의 무게 감소(Monossion et al., 1999)와 다음 세대 수컷의 정자형성능 감소가 초래된다(Matthew et al., 2006).

VCZ를 생후(postnatal days, PND) 50일 이전의 미성숙 수컷에 처리하면 사춘기 개시가 지연되고 관련 부속선들의 무게가 감소하는데, PND 35일에서 49일까지 100 mg/kg/day로 경구투여한 모델에서는 부정소와 저정량의 무게가 유의하게 감소하였고(Ashby and Lefevre, 2000), 같은 농도로 PND 22일부터 7일간 투여한 모델에서도 부정소와 저정량의 무게가 감소하였다(Ashby and Lefevre, 1997). 임신한 어미부터 이유기인 PND 21일까지 VCZ를 처리한 모델에서

정소의 무게는 증가하였고, 부정소와 저정량, 전립선의 무게는 감소하였으며, 항문-성기간 거리(anogenital distance, AGD)가 감소하였고, 사춘기 개시도 7일 정도 유의하게 지연되었다(Matsuura et al., 2005). VCZ는 사춘기 개시와 동시에 GnRH와 LH의 분비가 증가하는 수컷의 시상하부-뇌하수체(hypothalamus-pituitary, H-P) 호르몬 축에도 영향을 준다. 성체 수컷 흰쥐에 VCZ (150 mg/kg/day)를 5일간 경구투여한 결과, 뇌하수체에서 GnRH 수용체, LH 그리고 뇌하수체 특이적인 에스트로젠 수용체  $\alpha$ 의 아형인 truncated estrogen receptor product (TERP) mRNA의 발현이 증가하였다(Panida et al., 2008). 임신 중기의 어미에게 분만 후 4주까지 VCZ를 매일 경구투여(10 mg/kg/day)한 결과, 시상하부의 preoptic-anterior hypothalamic area (POA)에서 GnRH 펩티드가 감소하였다는 보고도 있다(Bisenius et al., 2006).

항 안드로젠성 물질인 VCZ가 암컷에서 나타내는 생식독성에 대한 연구가 수컷에 비해 절대 부족한데, 이는 bisphenol-A (BPA), octylphenol 그리고 genistein 등의 에스트로젠성 물질에 노출될 때보다 결과를 해석하기 쉽지 않기 때문이다. 그런데 유사한 항 안드로젠성 물질인 di (2-ethyl hexyl) phthalate (DEHP)이 암컷 흰쥐의 사춘기 개시에 미치는 효과에 대한 연구로부터 VCZ의 효과를 간접적으로 예측할 수 있다(Rasier et al., 2007). 실제로 DEHP와 VCZ는 공히 암컷의 사춘기 개시를 유의하게 지연시키고, 난소와 자궁에서 프로게스테론 수용체 발현을 감소시켰다(Lee and Lee, 2006a, b; An and Lee, 2007). 본 연구자들은 VCZ 투여에 의해 유도되는 암컷 흰쥐에서의 사춘기 개시 지연이 VCZ의 항 안드로젠 효과에 의해 시상하부-뇌하수체-난소(hypothalamus-pituitary-ovary, H-P-O) 호르몬 축 활성이 교란되었기 때문이라고 가정하였는데, 지금까지 내분비 장애물질과 사춘기 GnRH의 분비에 관련된 연구는 대부분 성 부속선에서 스테로이드

호르몬 수용체의 mRNA 발현 양상을 비교하고 혈중 스테로이드를 측정하는 수준에서 이루어졌다. 본 연구에서는 기존의 연구범위를 확장시켜 미성숙 암컷 흰쥐의 시상하부-뇌하수체 축 상에서 발현되는 생식호르몬 관련 유전자들의 활성화에 미치는 VCZ의 효과를 측정하였다. 우선, 사춘기에 직접적인 영향을 주는 시상하부 GnRH 발현의 상위단계 조절자인 Enhanced at Puberty-1 (EAP-1), glutamic acid decarboxylase67 (GAD67) 그리고 nitric oxide synthase-2 (NOS-2)의 시상하부내 발현 양상을 조사하였다. 또한, GnRH 발현의 주요 조절 인자로 널리 알려진 *KiSS-1*, GPR54의 발현 양상과 GnRH 작용의 하위 단계인 뇌하수체의 LH와 FSH의 발현 양상을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험동물

상명대학교 실험동물 사육장에서 일정한 온도와 광주기 (18~22°C; 12시간 조명, 12시간 소등), 먹이와 물 섭취가 자유로운 상태(*ad libitum*)에서 사육한 Sprague-Dawley (SD) strain 흰쥐를 사용하였다. 생후 21일(35~40 g B.W.)된 미성숙 암컷 흰쥐에 VCZ (10 mg/kg/day; Sigma, USA)를 매일 복강 주사하였고, 대조군으로는 DMSO (200 µL/animal; Duksan, Korea)를 주사하였다. 동물들은 매일 오전 10시에 주사 후 체중을 측정하고 질구개방 여부를 확인하였다. 질구개방이 일어난 경우, 생리식염수를 사용한 질 도말법(vaginal smear)으로 슬라이드에 도포한 질 상피세포를 현미경하에서 확인하고 오후 5시에 희생시켰다. 희생 후 즉시 뇌하수체와 시상하부를 적출하여 total RNA를 추출하였다.

### 2. Total RNA 추출

Total RNA는 guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction method (Chomzynski and Sacchi, 1987)에 따라 추출하였다. 1 volume의 water-saturated phenol, 0.2 volume의 chloroform과 0.1 volume의 3M sodium acetate (pH 5.2)를 분쇄한 조직에 첨가하였다. 1.5 mL의 microcentrifuge tube에서 부드럽게 혼합 후, 4°C 12,000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 상층액을 새로운 microcentrifuge tube에 옮긴 후 동량의 isopropanol을 넣어 -20°C에서 1시간 이상 보관하였다. RNA 추출물을 4°C 12,000 rpm에서 20분간 원심분리

하여 pellet을 생성하도록 한 후 상층액을 제거하였다. Pellet은 70% ethanol로 2회 세척하여 공기 중에서 건조시켰다. RNA가 완전히 건조되기 직전에 0.1% DEPC-D.W.에 녹여 주었다. RNA 용액은 spectrophotometer를 이용하여 260 nm 파장에서 정량하였다.

### 3. Semi-Quantitative RT-PCR

1 µg의 total RNA를 주형으로 dT<sub>20</sub> primer (0.5 µg)와 AccuPower™ RT Premix (Bioneer, Korea)를 사용하여 역전사시켰다. 합성한 cDNA와 Taq DNA polymerase (iNtRON)를 혼합하여 MasterCycler (eppeendorf)로 PCR을 시행하였고, 표적 유전자들은 EAP-1, GAD67, NOS-2, *KiSS-1*, GPR 54, GnRH, Ca, LH-β, FSH-β이었으며, 정량을 위한 control PCR로는 GAPDH primer를 사용하였다. 본 실험에 사용된 primer들과 PCR 조건은 Table 1에 기술하였다. 각 조건의 PCR 산물들은 1.5% agarose gel (FMC Bioproduct, USA)로 전기 영동하여 분리하였으며, 0.5 µg/mL의 ethidium bromide (Sigma, USA)로 염색하여 Gel-documentation program (UVI BAND)을 사용하여 각각의 밴드의 강도를 측정하였다.

### 4. 통계 처리

실험 결과의 통계적 처리는 Student's *t*-test에 의해 이루어졌으며, *P*-value 0.05 이하를 통계적으로 유의하다고 판정하였다.

## 결 과

생후 21일부터 주사를 시작하여 미성숙 암컷 흰쥐의 사춘기 개시 지표로 널리 사용되는 질구개방이 일어난 날을 조사한 결과, 총 주사일 수는 대조군에 비해 VCZ 투여군에서 유의하게 증가하였다(An and Lee, 2007). 사춘기 개시와 관련된 각종 지표 유전자들의 발현조사는 먼저 사춘기 개시시점에 급등하는 시상하부 GnRH 발현을 상위단계에서 조절하는 Enhanced at Puberty-1 (EAP-1), glutamic acid decarboxylase67 (GAD67) 그리고 nitric oxide synthase-2 (NOS-2)의 시상하부내 발현 양상을 조사하였다. 전사 조절 인자인 EAP-1과 GABA 합성 효소인 GAD67의 발현은 VCZ 투여군이 대조군에 비해 낮은 경향을 보였으나 유의성은 없었다

**Table 1. Primer sets for semi-quantitative RT-PCR analysis**

Gene	Gene Bank No.	Primer sequence	Product size(bp)	AT(°C)
GAPDH	XM 214287	F 5'- CCATCACCATCTTCCAGGAG R 5'- CCTGCTTCACCACCTTCTTG	576	50
EAP-1	AY 879229	F 5'- AGCCCCAACTCATCTCAG R 5'- ACGCTCCTGGTCTGTGCTC	380	64
GAD67	M 76177	F 5' - CAGCCAGACAAGCAGTATGA R 5' - GAGATGACCATCCGGAAGAA	404	57
NOS-2	U 61282	F 5'- ACACACAGCGCTACAACATC R 5'- ACAGAAGCAAAGAACACCGC	427	65
<i>KiSS-1</i>	NM 181692	F 5'- ATCTCGCTGGCTTCTTGGA R 5'- GGAGTTCCAGTTGTAGGCTG	339	62
GPR54	AF 115516	F 5'- ACTGTCAGCCTTAGCATCTG R 5'- TGCTGTAGGACATGCAGTGA	599	63
GnRH	NM 012767	F 5'- CGCTGTTGTTCTGTIGACTG R 5'- GCTTCCTCTTCAATCAGACG	234	61
<i>C<math>\alpha</math></i>	BC 063160	F 5'- ATACTTCTCCAAGCTGGGTG R 5'- CGACACTCAGTGCCATCGCA	294	60
LH- $\beta$	NM 012858	F 5'- ATGGAGAGGCTCCAGGGGGT R 5'- CAGAAGAGGAGAAGGCGGGG	425	66
FSH- $\beta$	NM 001007597	F 5'- CCATGATGAAGTCGATCCAG R 5'- CTTATGGTCTCGTACACCAG	304	63

F: forward, R: reverse, A.T.: annealing temperature.

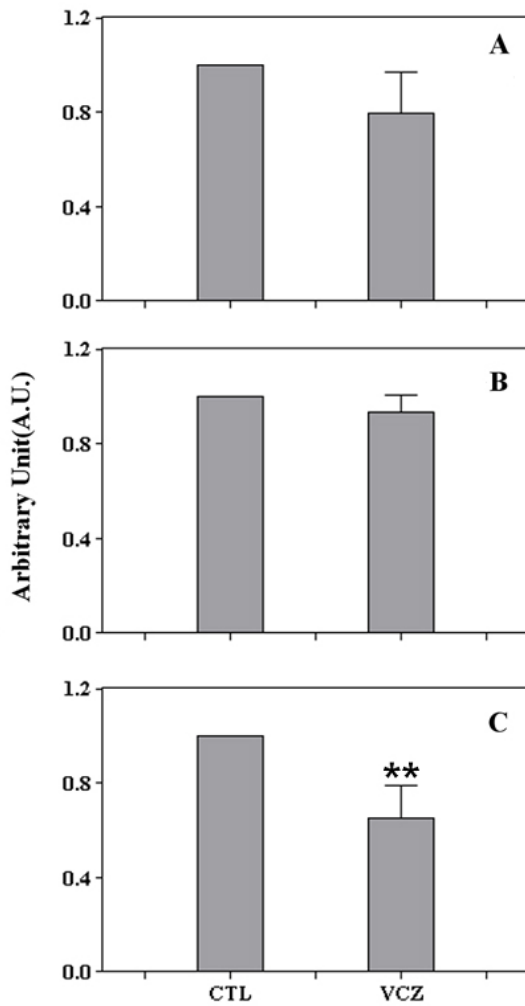
(Fig. 1A, B). 반면, 시상하부 GnRH 분비의 국부적 조절인자로 알려진 NO를 합성하는 효소인 NOS-2의 발현은 대조군에 비해 VCZ 처리군에서 유의하게 낮았다(1vs0.68,  $p < 0.01$ ; Fig. 1C). 최근 GnRH 발현의 직접적인 조절인자로 널리 알려진 *KiSS-1*-GPR54 시스템의 시상하부내 발현 양상도 추적하였다. GPR54 수용체를 통해 GnRH 분비를 강력하게 자극하는 *KiSS-1*의 시상하부에서 mRNA 수준은 VCZ 투여군이 대조군에 비해 유의적으로 감소하였고(1vs0.38,  $p < 0.01$ ; Fig. 2A), 마찬가지로 GPR54 또한 VCZ군에서 대조군에 비해 유의하게 감소하였다(1vs0.57,  $p < 0.01$ ; Fig. 2B). *KiSS-1*과 GPR54의 발현 감소와 함께 시상하부 GnRH mRNA 수준도 VCZ 투여군에서 유의하게 감소하였다(1vs0.59,  $p < 0.01$ ; Fig. 2C). H-P축의 하위 단계로서 시상하부로부터의 GnRH 입력을 받는 뇌하수체 전엽에서의 glycoprotein hormone  $\alpha$  subunit과 LH와 FSH의  $\beta$ -subunit의 발현 양상을 조사한 결과,  $C\alpha$ 의 발현은 VCZ 투여군과 대조군이 큰 차이를 보이

지 않았지만(Fig. 3A), LH  $\beta$ -subunit 발현의 경우, VCZ 투여군이 대조군보다 유의하게 낮게 나타났다(1vs0.55,  $p < 0.01$ ; Fig. 3B). 유사하게, FSH mRNA의 발현 또한 대조군에 비해 VCZ 투여군이 유의하게 낮았다(1vs0.68,  $p < 0.01$ ; Fig. 3C).

## 고 찰

본 연구에서는 암컷 시상하부-뇌하수체 축에서 사춘기와 관련된 지표 유전자들의 발현에 미치는 VCZ의 영향을 조사하였다. 정상적인 사춘기의 시작은 영양상태, 일주기(circadian rhythm), 스트레스 등의 환경적 신호(environmental signal)와 성선호르몬, 렙틴, ghrelin, IGF-I, insulin 등의 말초성 신호(peripheral signal)로 인해 시상하부에서 신경전달물질들과 신경펩타이드들을 통해 GnRH의 맥동적 분비로 시작된다(Parent et al., 2003).

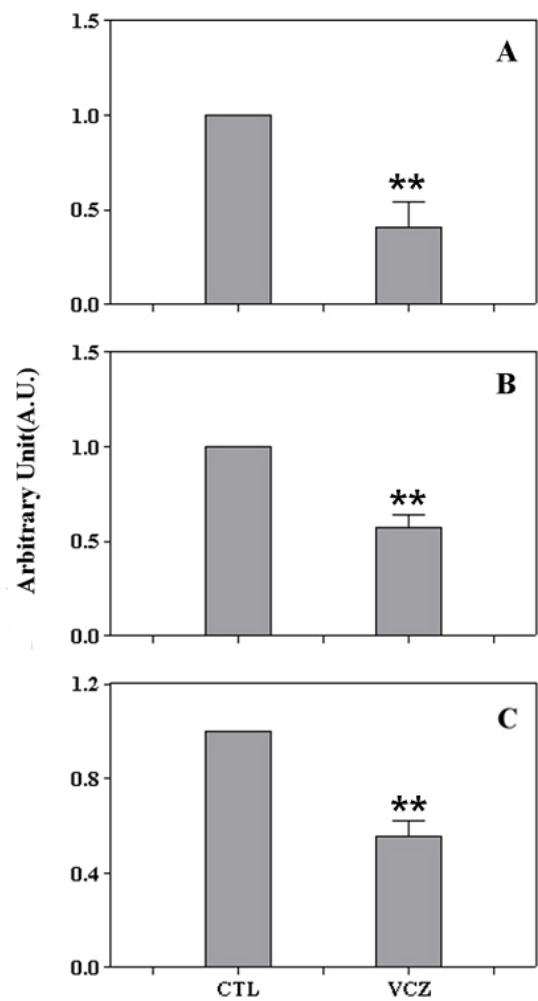
사춘기 개시를 유도하는 GnRH의 맥동적 증가에는 gluta-



**Fig. 1.** Effects of prepubertal VCZ administration on the expression of EAP-1 (A), GAD67 (B) and NOS-2 (C) in the hypothalami from the rats sacrificed at PND 34. Animals were sacrificed on the day after V.O. of control rats. Semi-quantitative RT-PCR was carried out as described in 'Materials and Methods'. Values are expressed as mean  $\pm$ S.E. (n=5 per group).

\*\*Significantly different from control group,  $p < 0.01$ .

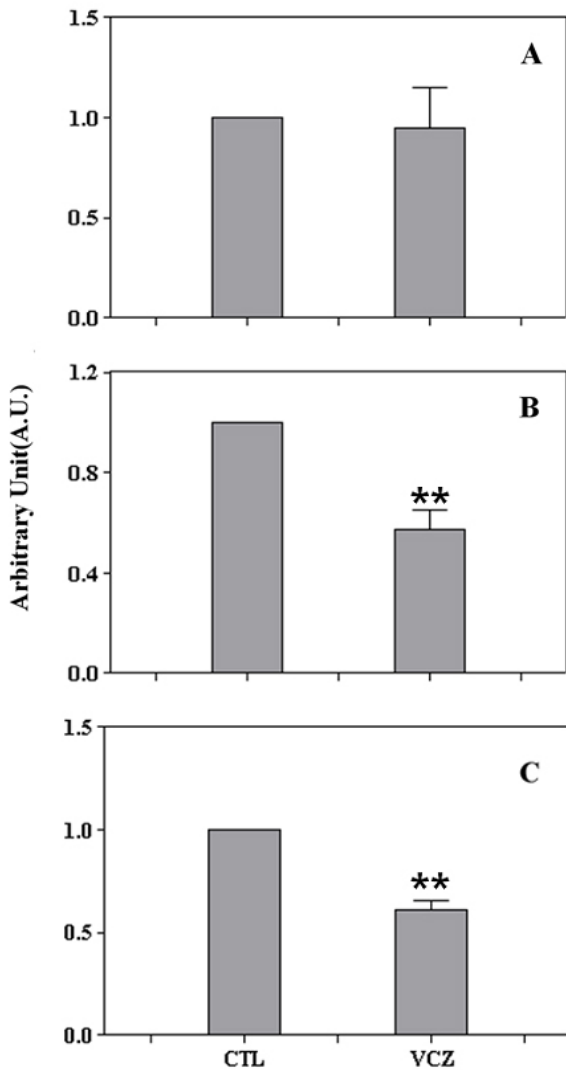
mate와 kisspeptin 뉴런이 중요한 역할을 함이 알려졌는데, GABA의 전구체이기도한 glutamate는 직접적으로도 GnRH 뉴런에 작용해 분비를 증가시키며, *KiSS-1* 유전자 발현 산물인 kisspeptin은 그 수용체인 GPR54를 통해 GnRH 분비를 강력하게 자극한다(Ebling, 2005). 특히, kisspeptin을 생쥐의 제 3뇌실에 투여하면 조기 사춘기가 유발되고, 특발성 성선 기능 저하증(Thrombocytopenic Hypogonadotropic hypo-



**Fig. 2.** Effects of prepubertal VCZ administration on the expression of *KiSS-1* (A), GPR54 (B) and GnRH (C) in the hypothalami from the rats sacrificed at PND 34. Animals were sacrificed on the day after V.O. of control rats. Semi-quantitative RT-PCR was carried out as described in 'Materials and Methods'. Values are expressed as mean  $\pm$ S.E. (n=5 per group).

\*\*Significantly different from control group,  $p < 0.01$ .

gonadism) 환자에서 Kisspeptin의 돌연변이가 발견되므로 kisspeptin/GPR54 시스템은 사춘기 진행에 매우 중요하다 (Seminara et al., 2003; Shahab et al., 2005). GnRH의 분비는 또한 여러 효소와 전사인자들에 의해 조절된다. 그 중 GAD는 glutamate에서 GABA로의 전환을 매개하는 효소인데, 두 개의 유전자로부터 유래하는 각각 다른 분자량(67kDa, 65kDa) 형태로 존재한다(Michelsen et al., 1991; Bu et al.,



**Fig. 3.** Effects of prepubertal VCZ administration on the expression of *Cα* (A), *LH-β* (B) and *FSH-β* (C) in the pituitaries from the rats sacrificed at PND 34. Animals were sacrificed on the day after V.O. of control rats. Semi-quantitative RT-PCR was carried out as described in 'Materials and Methods'. Values are expressed as mean  $\pm$  S.E. (n=5 per group). \*\*Significantly different from control group,  $p < 0.01$ .

1992). 사춘기 이전 시기의 시상하부 내측융기에 GAD antisense oligomer를 주입한 결과 GnRH 분비가 증가하였고, GAD65보다는 GAD67의 antisense oligomer가 GnRH의 분비에 미치는 영향이 더 크다는 보고가 있다(Mitsushima et al., 1996). C14ORF4로 더 잘 알려진 전사인자인 EAP-1도

사춘기의 시상하부 GnRH의 분비에 영향을 미치는데, 암컷 사춘기동안 시상하부의 EAP-1의 발현 증가가 사춘기 과정을 통제하는 요인 중 하나라는 보고가 있다(Rampazzo et al., 2000; Ojeda et al., 2005). 시상하부에서 발현되는 EAP-1은 glutamate, GABA, *KiSS-1*이 GnRH의 분비를 조절하는 것에 관여하여 억제적 신호를 나타내는데, EAP-1 프로모터의 전사활성은 사춘기 과정을 방해하는 유전자들의 발현을 억제하기 위해 사춘기 개시 시점에 발현이 증가하고, siRNA를 이용하여 시상하부 EAP-1 발현을 억제시킨 모델에서는 사춘기가 지연되고, 성체기의 생식주기에 이상이 온다는 보고가 있다(Heger et al., 2005). NOS에 의해 합성되는 NO는 체내에서 다양한 생리기능을 담당하는 것으로 잘 알려져 있는데(Knowles et al., 1989; Snyder et al., 1992), 암컷의 생식 기관들에서 NO는 분만, 임신, 착상, 수란관의 기능과 스테로이드 합성과정의 중요한 조절인자로 인식되고 있고, 특히 난포합성과정중 NO와 GnRH 분비 간의 상관관계가 잘 알려져 있다(Rosselli et al., 1998). GnRH가 주로 발현되는 preoptic area (POA)에서 NOS의 발현 패턴이 GnRH 패턴과 일치함이 면역조직화학법을 통해 확인되었고, *in vivo*에서 NOS 억제제를 처리한 결과 GnRH의 맥동성과 분비가 억제되었다(Rettori et al., 1993).

뇌하수체 전엽에서 분비되는 성선자극 호르몬인 LH와 FSH는 시상하부 GnRH 분비에 의해 조절되고, 에스트로겐 합성을 위해 난소의 과립세포를 자극하는데(Maurer, 1987), LH와 FSH는 성체기의 생식 활성화에 중요할 뿐만 아니라 HPO 축의 발달에서도 중요한 역할을 한다. 미성숙 암컷 흰쥐에서 난소의 활성화로 인한 사춘기 개시시점 이전 시기(PND 8-21)의 혈중 FSH는 극적으로 증가되는데, 이런 FSH의 극적인 증가는 사춘기 이전 시기의 뇌하수체에서 LH-β, FSH-β 그리고 GnRH 수용체 발현의 상승으로 인하여 조절된다(Maurer, 1987). 뇌하수체에서 FSH-β와 GnRH 수용체의 mRNA 발현은 PND 12일에 절정에 이르고, LH-β의 경우는 PND 18일까지 계속해서 상승하고, GnRH의 길항제를 PND 8일에서 10일까지 매일 투여한 결과, 혈중 FSH는 선택적으로 감소하였고, PND 11일부터 13일까지 투여했을 때는 혈중 LH와 FSH 모두 유의하게 감소하였다(Melinda and Robert, 1997). 한편, 암컷의 사춘기를 지연시키고 생식독성을 유발하는 내분비계 장애물질의 예로는 dichloro-diphenyl-trichloroethane (DDT), methoxychlor, di (2-ethyl hexyl) phthalate (DEHP)

등을 들 수 있다. DDT가 미성숙 암컷에 노출되면 비정상적인 형태의 난소가 나타나고 혈중 에스트로겐 수치가 상승함이 보고되었고(Guillette et al., 1995), PND 6일부터 10일까지 DDT를 처리한 모델에서 GnRH의 맥동성과 혈중 LH가 유의하게 감소하였다(Rasier et al., 2007). 또한, methoxychlor에 노출시키면 자궁과 난소의 에스트로겐 수용체와 결합하여 정상적인 호르몬의 결합을 방해하는데(Gray et al., 1999), 반면 항 안드로젠성 물질인 methoxychlor가 에스트로젠성 물질로 작용하여 암컷의 사춘기를 유의하게 촉진시킨다는 보고도 있다(Laws et al., 2000). 한편, 설치류에 DEHP를 *in vivo*로 노출할 경우, 난소의 에스트로겐 합성 저하, 생식주기 연장, 그리고 무배란이 유도되었고, 황체가 결여된 낭포성(cystic) 난소가 출현하였다(Davis et al., 1994). 본 연구자들의 이전 보고에서 DEHP는 사춘기 개시를 대조군의 생후 35.3±0.7일에서 37.3±0.7일로 유의하게 지연시켰고, 난소와 자궁에서 에스트로겐 수용체  $\alpha$ ,  $\beta$  subunit, 프로그스테론 수용체 그리고 LH 수용체의 발현을 감소시켰다(Lee and Lee, 2006a,b). 유기주석계 화합물(organotin compounds)인 triphenyltin (TPT)를 PND 23일부터 절구개방이 될 때까지 고농도(6 mg/kg/day)로 경구투여한 결과, 대조군에 비해 사춘기의 개시가 유의하게 지연되었으나, 저농도(2 mg/kg/day) 투여 조건에서는 오히려 대조군에 비해 유의하게 촉진되었다(Konstanze et al., 2006). VCZ처럼 제초제의 주성분으로 널리 쓰이는 glyphosate는 암, 수 모두에서 항 안드로젠 또는 항 에스트로젠성 물질로 작용한다. 임신기 어미부터 출생 후 이유기 시기까지 glyphosate를 처리한 모델에서 어미에게는 생식독성이 나타나지 않았으나 그 자손들에서 심각한 생식 교란이 나타났는데, 성체기 수컷의 부정소 정자수가 감소하고 비정상 정자수가 늘어났으며, 사춘기의 혈중 테스토스테론 수치가 농도 의존적으로 감소하였고, 암컷에서는 사춘기 개시가 유의하게 지연되었다(Dallegrave et al., 2007).

본 연구자들은 암컷 흰쥐에서 VCZ에 의한 사춘기 개시 지연이 VCZ의 항 안드로젠 효과에 의한 시상하부-뇌하수체-난소(hypothalamus-pituitary-ovary, H-P-O) 호르몬 축 활성의 교란 때문이라고 가정하였는데, 본 연구 결과는 대체로 그 가설을 지지하는 것으로 판단된다. 특히, 사춘기 개시시점에 GnRH와 공동발현 양상을 보이는 NOS-2의 경우에 VCZ 투여군에서 대조군에 비해 유의하게 발현이 감소하였다(Fig. 1). GPR54, *KiSS-1*, GnRH의 발현 역시 사춘기가 개시된 대

조군에 비하여 여전히 사춘기 이전 상태인 VCZ 투여군에서 발현이 유의하게 낮았다(Fig. 2). 이는 사춘기 개시를 결정하는 GPR54/*KiSS-1* 시스템이 이미 사춘기 개시가 된 대조군에 비해 VCZ 투여군에서는 활성화되지 않아 사춘기 개시가 지연되었음을 시사한다. 또한, GnRH에 의해 분비가 조절되는 뇌하수체 LH와 FSH  $\beta$ -subunit의 발현량은 VCZ 투여군에서 대조군에 비해 유의하게 감소하였지만,  $\text{Ca}$ -subunit은 큰 차이를 보이지 않았다(Fig. 3). 이는 LH와 FSH의  $\beta$ -subunit과  $\text{Ca}$ -subunit이 GnRH에 의해 분비된다는 점은 같지만, 전사활성의 조절 기전은 상이하기 때문으로 추정된다.

마지막으로, 본 연구는 VCZ 투여농도를 NOAEL 수준 이하인 10 mg/kg/day로 결정하여 타 연구자들에 비해 상대적으로 저농도에서의 효과를 측정하였는데, 향후 연구에는 실제 다수의 인간에게 노출될 가능성이 있는  $\mu\text{g}$  단위까지의 저농도 노출에 대한 연구가 필요하다. 또한, 내분비계 장애물질의 전신적 작용(systemic action)의 기작과 영향을 상세히 이해하기 위해서는 시상하부-뇌하수체 신경내분비 축은 물론 하위단계인 난소와 자궁에서의 스테로이드 호르몬 수용체의 발현 등 다양한 생식지표에 대한 연구도 필요할 것으로 사료된다.

## 감사의 글

본 연구는 상명대학교 자연과학연구소 연구비(2008) 지원으로 수행되었음.

## 인용문헌

- An NK, Lee SH (2007) Effect of vinclozolin on the onset of puberty in immature female rats. *Dev Reprod* 11: 245-251.
- Ashby J, Lefevre PA (1997) The weanling male rat as an assay for endocrine disruption: preliminary observations. *Regul Toxicol Pharm* 26:330-337.
- Ashby J, Lefevre PA (2000) The peripubertal male rat assay as an alternative to the Hershberger castrated male rat assay for the detection of anti-androgens, oestrogens and metabolic modulators. *J Appl Toxicol* 20:35-47.
- Bisenius Erin S, Veeramachaneni DN Rao, Sammonds

- Ginger E, Tobet Stuart (2006) Sex differences and the development of the rabbit brain: effects of vinclozolin. *Biol Reprod* 75:469-476.
- Bu DF, Erlander MG, Hintz BC, Tillakaratne NJ, Kaufman DL, Wagner-McPherson CB, Evans GA, Tobin AJ (1992) Two human glutamate decarboxylases, 65kDa GAD and 67 kDa GAD, are each encoded by a single gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:2115-2119.
- Chomzynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by RNA guanidium thiocyanate phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-159.
- Dallegrave E, Mantese FD, Oliveira RT, Andrade AJ, Dalsenter PR, Langeloh A (2007) Pre- and postnatal toxicity of the commercial glyphosate formulation in Wistar rats. *Arch Toxicol* 81:665-673.
- Davis BJ, Maronpot RR, Heindel JJ (1994) Di-(2-ethylhexyl) phthalate suppresses estradiol and ovulation in cycling rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 128:216-223.
- Ebling FJ (2005) The neuroendocrine timing of puberty. *Reproduction* 129:675-683.
- Gray LE, Ostby JS, Kelce WR (1994) Developmental effects of an environmental antiandrogen: the fungicide vinclozolin alters sex differentiation of the male rat. *Toxicol Appl Pharmacol* 129:46-52.
- Gray LE Jr, Ostby J, Monosson E, Kelce WR (1999) Environmental antiandrogens: low does of the fungicide vinclozolin alter sexual differentiation of the male rat. *Toxicol Ind Health* 15:48-64.
- Guillette LJ Jr, Crain DA, Rooney AA, Pickford DB (1995) Organization versus activation: the role of endocrine-disrupting contaminants (EDCs) during embryonic development in wildlife. *Environ Health Perspect* 103:157-64.
- Heger S, Mastronardi C, Lomniczi A, Cabrera R, Roth C, Sippell WG, Jung H, Disson GA, Ojeda SR (2005) Role of a novel gene (enhanced at puberty, EAP-1) in the regulation of female puberty. *Horm Res* 64:1-22.
- Kelce WR, Monosson E, Gamcsik MP, Laws SC, Gray LE Jr (1994) Environmental hormone disruptors: evidence that vinclozolin developmental toxicity is mediated by antiandrogenic metabolites. *Toxicol Appl Pharmacol* 126:276-285.
- Kelce WR, Monosson E, Gray LE Jr (1995) An environmental antiandrogen. *Recent Prog Horm Res* 50:449-453.
- Knowles RG, Palacios M, Palmer RMJ, Moncada S (1989) Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:5159-5162.
- Laws SC, Carey SA, Ferrell JM, Bodman GJ, Cooper RL (2000) Estrogenic activity of octylphenol, nonylphenol, bisphenol A and methoxychlor in rats. *Toxicol Sci* 54:154-167.
- Lee KY, Lee SH (2006) Effect of di (2-ethyl hexyl) phthalate (DEHP) on the onset of puberty in female rat. *Dev Reprod* 10:147-154.
- Lee KY, Lee SH (2006) Effects of endocrine disruptors on the expression of estrogen receptors in ovary and uterus from immature rats. *Dev Reprod* 10:255-261.
- Matsuura I, Saitoh T, Ashina M, Wako Y, Iwata H, Toyota N, Ishizuka Y, Namiki M, Hoshino N, Tsuchitani M (2005) Evaluation of a two-generation reproduction toxicity study adding endpoints to detect endocrine disrupting activity using vinclozolin. *J Toxicol Sci* 30: S163-S188.
- Matthew D Anway, Mushtaq A Memon, Mehmet Uzumcu, Michael K Skinner (2006) Transgenerational effect of the endocrine disruptor vinclozolin on male spermatogenesis. *J Androl* 27:868-879.
- Michelsen BK, Petersen JS, Boel E, Moldrup A, Dyrberg T, Madsen OD (1991) Cloning, characterization, and autoimmune recognition of rat islet glutamic acid decarboxylase in insulin-dependent diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:8754-8758.
- Mitsushima D, Marzban F, Luchansky LL, Burich AJ, Keen KL, Durning M, Golos TG, Terasawa E (1996) Role of glutamic acid decarboxylase in the prepubertal inhibition of the luteinizing hormone-releasing hormone



- release in female rhesus monkeys. *J Neurosci* 16:2563-2573.
- Molina-Molina JM, Hillenweck A, Jouanin I, Zalko D, Cravedi JP, Fernandez MF, Pillon A, Nicolas JC, Olea N, Balaguer P (2006) Steroid receptor profiling of vinclozolin and its primary metabolites. *Toxicol Appl Pharmacol* 216:44-54.
- Monosson E, Kelce WR, Lambright C, Ostby J, Gray LE Jr (1999) Peripubertal exposure to the antiandrogenic fungicide, vinclozolin, delays puberty, inhibits the development of androgen-dependent tissues, and alters androgen receptor function in the male rat. *Toxicol Ind Health* 15:65-79.
- Nellemann C, Dalgaard M, Lam HR, Vinggaard AM (2003) The combined effects of vinclozolin and procymidone do not deviate from expected additivity *in vitro* and *in vivo*. *Toxicol Sci* 71:251-262.
- Ojeda SR, Lomniczi A, Mungenast A, Mastronardi C, Parent AS, Roth C, Prevot V, Heger S, Jung H (2005) Towards understanding the neurobiology of mammalian puberty: genetic, genomic and proteomic approaches. *Horm Brain* 10:47-60.
- Panida Loutchanwoot, Wolfgang Wuttke, Hubertus Jarry (2008) Effects of a 5-day treatment with vinclozolin on the hypothalamo-pituitary-gonadal axis in male rats. *Toxicology* 243:105-115.
- Kubota Kunihiro, Ohsako Seiichiroh, Kurosawa Shuichi, Takeda Ken, Qing Wu, Sakaue Motoharu, Kawakami Takashige, Ishimura Ryuta, Tohyama Chiharu (2003) Effect of vinclozolin administration on sperm production and testosterone biosynthetic pathway in adult male rat. *J Reprod Develop* 49:403-412.
- Parent AS, Teilmann G, Juul A, Skakkebaek NE, Toppari J, Bourguignon JP (2003) The timing of normal puberty and the age limits of sexual precocity: variations around the world, secular trends, and changes after migration. *Endocr Rev* 24:668-693.
- Rampazzo A, Pivotto F, Occhi G, Tiso N, Bortoluzzi S, Rowen L, Hood L, Nava A, Danieli GA (2000) Characterization of C14ORF4, a novel intronless human gene containing a polyglutamine repeat, mapped to the ARVD1 critical region. *Biochem Biophys Res Commun* 278:766-774.
- Rasier G, Parent AS, Gérard A, Lebrethon MC, Bourguignon JP (2007) Early maturation of gonadotropin-releasing hormone secretion and sexual precocity after exposure of infant female rats to estradiol or dichlorodiphenyltrichloroethane. *Biol Reprod* 77:734-742.
- Rettori V, Belova N, Dees WL, Nyberg CL, Gimeno M, McCann SM (1993) Role of nitric oxide in the control of luteinizing hormone-releasing hormone release *in vivo* and *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:10130-10134.
- Rosselli M, Keller PJ, Dubey RK (1998) Role of nitric oxide in the biology, physiology and pathophysiology of reproduction. *Hum Reprod Update* 4:3-24.
- Seminara SB, Messenger S, Chatzidaki EE, Thresher RR, Acierno JS, Shagoury JK, Bo-Abbas Y, Kuohung W, Schwinof KM, Hendrick AG, Zahn D, Dixon J, Kaiser UB, Slaugenhaupt SA, Gusella JF, O'Rahilly S, Carlton MB, Crowley WF Jr, Aparicio SA, Colledge WH (2003) The GPR54 gene as a regulator of puberty. *New Engl J Med* 349:1614-1627.
- Shahab M, Mastronardi C, Seminara SB, Crowley WF, Ojeda SR, Plant TM (2005) Increased hypothalamic GPR 54 signaling: a potential mechanism for initiation of puberty in primates. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 2129-2134.
- Snyder SH, Bredt DS (1992) Biological roles of nitric oxide. *Sci Am* 266:68-77.
- Wong C, Kelce WR, Sar M, Wilson EM (1995) Androgen receptor antagonist versus agonist activities of the fungicide vinclozolin relative to hydroxyflutamide. *J Biol Chem* 270:19998-20003.